Beitrag zur Kenntnis der stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe der Wurzeln von Bryonia dioeca

Auszug der

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung der Doktorwürde
verfaßt und
der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Hermann Linde

aus
Bremen
1956

Tag der mündl. Prüfung:
11.Febr. 1957

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg in der Zeit vom 3. Februar 1954 bis zum 1. Nov. 1956 von mir ausgeführt und zusammengestellt.

Herrn Professor Dr. R.Dietzel sage ich für die mir angediehene Leitung meinen Dank. Desgleichen danke ich Herrn Dr. P. Tunmann für zahlreiche Anregungen und Ratschläge.

R.UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die kürzlich durch TUNMANN und WOLF (1) erfolgte Untersuchung der Wurzeln von Bryonia dioeca Jacqu. auf glykosidische Inhaltsstoffe bot Anlaß, auch die stickstoffhaltigen Bestandteile zu ermitteln. Bisher isolierten MAZZA und GRECO (2) 1928 einen schwach basischen Körper, den sie als Alkaloid ansprachen, und TUNMANN und WOLF (1) 1956 eine kristalline Substanz, die wegen geringer Menge nicht identifiziert werden konnte.

Die Herstellung eines alkoholischen Auszuges der Droge erfolgte durch Evakolation. Nach der Entfernung von Ballaststoffen durch eine Bleifällung wurde das Äthanol abgezogen und die zurückbleibende wäßrige Lösung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt.

Zunächst wurde die Lösung beim p_H 5,2 mit Äther, Benzol und Chloroform extrahiert. Die Äther- und Benzol-Fraktionen waren im Gegensatz zur Chloroform-Ausschüttelung stickstoffrei. Letztere stellte nach Entfernung des Lösungsmittels eine gelbbraune Masse dar, die durch mehrmalige Chromatographie an Aluminiumoxyd (Brockmann) nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Die Menge war sehr gering, eine Identifizierung daher nicht möglich.

Aus der Äther-Ausschüttelung schied sich beim Einengen eine farblose Substanz ab, die nach mehrmaliger Umkristallisation aus Sternchen oder seidig glänzenden Schuppen bestand. Eine C-H-Bestimmung ergab Werte, die etwa auf das von POWER und MOORE (3), MAZZA und GRECO (2) und ANGELETTI (4) gefundene Bryonol paßten. Der Schmelzpunkt von 258° unter Zersetzung (KOFLER) lag etwas höher als die von den anderen Autoren angegebenen Werte: POWER und MOORE (3) 210-212°, MAZZA und GRECO (2) 230°, ANGELETTI (4) 218°. Man erhielt positive Reaktionen nach LIEBERMANN-BURCHARD, SALKOWSKI und CARR-PRICE. - Von POWER und SALWAY (5) wurde 1913 berichtet, daß sich Bryonol in Glukose und ein Phytosterin vom Schmelzpunkt 90-100° hydrolysieren läßt. Bei saurer Hydrolyse der isolierten Substanz fand man neben Glukose (Nachweis papierchromatographisch) einen in farblosen Schuppen kristallisierenden Körper, der bei 211-215° schmolz. Ein Acetylprodukt dieses Stoffes kristallisierte in dünnen Nadeln vom FP 156°. Acetylverbindungen, welche direkt aus dem Bryonol dargestellt wurden, hatten

Schmelzpunkte von 152° (POWER und MOORE,3),158° (MAZZA und GRECO,2) 156-158° (ANGELETTI,4). Es ist möglich,daß es sich trotz der Differenzen bei der gefundenen Substanz um Bryonol handelt. Da die Substanz nicht zum eigentlichen Gebiet dieser Arbeit gehörte,wurde sie nicht weiter bearbeitet.

Nach den Ausschüttelungen im schwach sauren Milieu wurden die wasserdampfflüchtigen Amine aus dem Extrakt bei sodaalkalischer Reaktion abdestilliert und in verd.Salzsäure aufgenommen. Es handelte sich hauptsächlich um Ammoniak,welches durch eine Reaktion mit 2,4-Dinitro-1-naphthol (6) erkannt wurde. Man entfernte es vor dem papierchromatographischen Nachweis der Amine mit gelbem Quecksilberoxyd (7). Anschließend wurden die Amine auf Papieren identifiziert,die mit Natriumacetat (8) oder sek.Natriumphosphat (9) gepuffert waren. Alle Amine wurden mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Mit anderen Reagentien wie Phosphormolybdänsäure,Dragendorffs-Reagens (10),Joddampf (8) konnten keine weiteren Amine erkannt werden. Die Identifizierung erfolgte im Mischchromatogramm. Es wurden folgende Amine ermittelt: Äthylamin, n-Butylamin,Methylamin,i-Amylamin,Aminoäthanol. Damit ist erneut das Vorkommen von Colamin in Pflanzenextrakten nachgewiesen. Dieses wurde außer mit Ninhydrin auch mit Isatin (9) identifiziert. - Nach der Mikromethode von KLEIN und STEINER (6) wurden festgestellt: Ammoniak, Äthylamin,Methylamin. Ammoniak wurde außerdem durch Platinbestimmung des Ammoniumchloroplatinates nachgewiesen.

Anschließend wurde der alkalische Extrakt mit Äther,Chloroform und Amylalkohol ausgeschüttelt. Die Amylalkohol-Fraktion enthielt geringe Mengen Stickstoff,der nicht identifiziert wurde. Um ein Alkaloid,das verschiedene Autoren (11) annehmen,scheint es sich jedoch nicht zu handeln,da sich ein solches papierchromatographisch mit dem Reagens nach THIES und REUTHER (10),das mit quartären und tertiären Aminen Färbungen gibt,nicht nachweisen ließ.

Die freien Aminosäuren wurden in einer kleinen Menge des nach den Ausschüttelungen vorliegenden Extraktes mittels einer NEUBERG (12) - Fällung abgetrennt. Die papierchromatographische Untersuchung ergab die Anwesenheit von: Citrullin,Alanin,Glycin,Valin, γ-Aminobuttersäure,Glutaminsäure,Asparaginsäure,Leucin,Isoleucin,Serin,Arginin, Lysin,Sarkosin.

Nach den Ausschüttelungen wurde in dem essigsauer gemachten

Extrakt eine Fällung mit Ammonreineckat ausgeführt. Aus dem einheitlich aus roten Schuppen bestehenden Niederschlag wurde die Base freigemacht, welche zur Identifizierung in das Dipikrylaminat übergeführt wurde. Analyse, Schmelz- und Mischschmelzpunkt waren für Cholindipikrylaminat charakteristisch. Auch Goldgehalt, Schmelz- und Mischschmelzpunkt eines daraus hergestellten Goldsalzes paßten auf Cholinchloraurat. Die Papierchromatographie lieferte einen zusätzlichen Identitätsbeweis für Cholin.

Aus dem Filtrat der Reineckat-Fällung entfernte man überschüssiges Reagens und trennte durch eine NEUBERG (12) - Fällung die freien Aminosäuren und den von TUNMANN und WOLF (1) isolierten Körper von dem Extrakt ab. Die Reindarstellung dieses Stoffes erfolgte durch präparative Papierchromatographie. Man erhielt eine einheitliche kristalline Substanz, die bei 251-254° schmolz. Es handelte sich um ein Peptid, da nach der präparativen Papierchromatographie immer noch Aminosäuren, die eigentlich abgetrennt sein mußten, anwesend waren, wenn man den Stoff heiß aus dem Papier eluierte.

Zur Analyse dieses Peptides wurde es in Salzsäure hydrolysiert. Bei der papierchromatographischen Untersuchung des Hydrolysates traten 8 Flecken auf, die alle erkannt wurden: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Threonin, Alanin, Leucin, Cystin. - Nach alkalischer Hydrolyse (Barytwasser) fand man die gleichen Aminosäuren, ausgenommen Cystin und Threonin, die bei alkalischer Hydrolyse zerstört werden.

Zur Bestimmung der Amino-Endgruppe des Peptides wurde es nach SCHROEDER und LEGETTE (13) in die Dinitrophenyl (DNP-)-Verbindung übergeführt. Diese hydrolysierte man in Salzsäure, schüttelte die freigewordene DNP-Aminosäure aus und identifizierte sie nach KOCH und WEIDEL (14). Es handelte sich um DNP-Asparaginsäure. Auch nach der Phenylisothiocyanat-Methode (15) ließ sich Asparaginsäure als Amino-Endgruppe ermitteln.

Die Identifizierung der Carboxyl-Endgruppe erfolgte nach Angaben von BAPTIST und BULL (16). Das Peptid wurde in Essigsäureanhydrid-Eisessig (zur Blockierung der freien Aminogruppen) mit Ammonrhodanid umgesetzt. Das entstandene Thiohydantoin wurde in saurer Lösung abgespalten, ausgeschüttelt, alkalisch hydrolysiert und die zurückgebildete Aminosäure papierchromatographisch ermittelt. Es wurde Alanin neben wenig Serin nachgewiesen. Bei alkalischer Hydrolyse geht Serin

teilweise in Alanin über (17). Da umgekehrt Alanin nicht zur Bildung von Serin Anlaß geben kann, ist die Möglichkeit ausgeschlossen, daß Alanin allein als Carboxyl-Endgruppe auftritt. Bei einem Parallelversuch, in dem unter gleichen Bedingungen das Verhalten des Thiohydantoin-Derivates von authentischem Serin untersucht wurde, schätzte man nach der Hydrolyse etwa das gleiche Mengenverhältnis Alanin-Serin wie nach der Carboxyl-Endgruppen-Ermittlung des Peptides. Daher ist das Vorkommen beider Aminosäuren als Endgruppe - also ein verzweigtes Peptid - unwahrscheinlich und Serin dürfte die alleinige Carboxyl-Endgruppe des Peptides bilden.

Im Filtrat der NEUBERG-Fällung wurde eine Fällung mit Xanthydrol-Lösung vorgenommen. Der Niederschlag bestand nach mehrmaliger Umkristallisation aus langen vielkantigen Prismen. Analyse, Schmelz- und Mischschmelzpunkt waren für Dixanthylharnstoff charakteristisch. Der Niederschlag wurde hydrolysiert und anschließend durch Schmelzpunkte und Papierchromatographie Harnstoff nachgewiesen. Wegen enzymatischer Prozesse (18) läßt sich jedoch nicht auf das Vorkommen in der frischen Wurzel schließen.

In einer Phosphorwolframsäure-Fällung, die im Anschluß an die Xanthydrol-Fällung im Extrakt ausgeführt wurde und mengenmäßig sehr gering war, ließ sich zwar wenig Stickstoff nachweisen, kristalline Verbindungen konnten jedoch nicht daraus gewonnen werden.

Beschreibung der Versuche

Extraktion: 14 kg Droge werden mit 75 %igem Äthanol im Evakolator erschöpfend extrahiert. Der gesammelte Extrakt wird im Vakuum eingeengt (10 Liter) und mit gesättigter äthanolischer Bleiacetat-Lösung (75 %iges Äthanol) versetzt bis nichts mehr ausfällt. Das Filtrat wird mit frisch gefälltem Bleihydroxyd behandelt. Die vom Niederschlag befreite Flüssigkeit wird mit Schwefelwasserstoff entbleit und nach Wasserzusatz das Äthanol im Vakuum abgezogen.

Bryonol: Die Extraktlösung wird ohne Zusatz von Alkalien erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt. Aus dem eingeengten Ätherextrakt fällt 38,5 mg eines farblosen Stoffes aus, der nach 3 maliger Umkristallisation aus Äthanol Sternchen oder Schuppen bildet. Eine Verbrennung ergibt folgende Werte:

$C_{22}H_{34}O_2(OH)_2$ (364,51)

Gef.:	C	71,49 %	H	10,04 %
Ber.:	C	72,4 %	H	9,9 %

Zur Hydrolyse werden 10 mg in 2 ml n-Schwefelsäure 6 Stunden am Rückfluß auf 100° erhitzt. Es tritt keine Lösung ein, die Substanz wird abfiltriert, die saure Lösung mit Äther extrahiert. Der Filterrückstand wird mit der Ausschüttelung vereinigt, die Flüssigkeit zur Trockene gebracht und der Rückstand zweimal aus Äthanol umkristallisiert: dünne, farblose Schuppen vom FP 211-215° unter Zersetzung (KOFLER). Die wäßrige Phase wird mit Barytwasser neutralisiert, der Niederschlag abzentrifugiert und mit heißem Wasser gewaschen. Waschwässer und Lösung werden vereinigt, eingeengt und papierchromatographisch absteigend auf S&S 2043b Mgl untersucht. Es läßt sich Glukose im Mischchromatogramm nachweisen; Laufmittel: PARTRIDGE-Gemisch, R_f-Wert 0,18; das Sichtbarmachen erfolgt mit Aniliniumphthalat. - Das Acetylprodukt der hydrolysierten Substanz wird dargestellt durch Erhitzen von 4 mg Substanz in 1 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml wasserfreiem Pyridin. Nach 30 min. Erhitzen auf 100° wird in 15 ml Wasser eingegossen, filtriert, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und die Lösung stark eingeengt: farblose Kristallnadeln, die nach einmaliger Umkristallisation aus Äthanol bei 156° (KOFLER) schmelzen.

Ermittlung der flüchtigen Amine: Die Extraktlösung wird mit ges. Natriumkarbonatlösung auf p_H 11 gebracht. Die fraglichen Stoffe werden im Vakuum bei 50° Badtemperatur so in eine Vorlage mit 30 ml 2 n-Salzsäure destilliert, daß das Ende des Vorstoßes in die Säure eintaucht. Das Ende der Destillation ist erreicht, wenn nach etwa 45 Minuten die übergehende Flüssigkeit mit NESSLER's Reagens nur noch eine schwach positive Reaktion gibt. Das Destillat wird im Vakuum bei 60° auf 15 ml eingeengt und im Exsikkator zur Trockene gebracht: farblose Kristalle. Zur Befreiung von Ammoniak wird 1 g des Rückstandes in 1,5 Liter Wasser gelöst, mit 500 g frisch gefälltem gelben Quecksilberoxyd versetzt und am Rührwerk 90 Min. auf 70° gehalten. Das Filtrat wird auf 0,5 ml eingeengt und davon jeweils 10 cmm zur Papierchromatographie aufgesetzt. Diese erfolgt absteigend auf S&S 2043b Mgl; Entwicklung mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) oder Propanol-Ameisensäure-Wasser (8:1:1)(19); Pufferung der Papiere wie im allgem. Teil angegeben. Die Amine werden in Mischchromatogrammen erkannt, das Sichtbarmachen der Flecken geschieht mit 0,15 %iger äthanolischer Ninhydrinlösung. R_f-Werte für Butanolgemisch und Phosphatpuffer: Äthylamin 0,49, n-Butylamin 0,75, Methylamin 0,36, i-Amylamin 0,82, Colamin 0,18. - Aus einer Lösung des Rückstandes wurde durch Fällung mit Platinchlorid-Lösung das Ammoniumchloroplatinat hergestellt. Nach der Umkristallisation aus einer Mischung von 70 % Äthanol, 25 % Wasser, 5 % conc. Salzsäure wird der Platingehalt bestimmt:

$(NH_4)_2 \cdot PtCl_6$ (444,05) Ber.: 43,97 % Pt Gef.: 43,90 % Pt

Amylalkohol-Ausschüttelung: Die sodaalkalische Extraktlösung wird mit Amylalkohol ausgeschüttelt. Der Amylalkohol wird im Vakuum abgezogen, der Rückstand in verdünnter Salzsäure aufgenommen und die Lösung mit Amylalkohol ausgeschüttelt. Die Extrakte sind stickstoffrei. Darauf wird alkalisch gemacht und die stickstoffhaltige Substanz wieder in Amylalkohol ausgeschüttelt. Dieser Reinigungsprozeß wird noch einmal wiederholt. Nach Entfernung des Lösungsmittels hinterbleibt sehr wenig einer bitteren, amorphen fast farblosen Substanz, die durch Chromatographie an basischem oder neutralem Aluminiumoxyd nicht kristallin erhalten werden kann. Mit dem Reagens nach THIES und REUTHER (10) läßt sich papierchromatographisch aus dieser Fraktion kein Alkaloid nachweisen. Mit Phosphormolybdänsäure dagegen kann man eine Substanz sichtbar machen; R_f-Werte: 0,62 in PARTRIDGE-Gemisch, 0,60 in tert.

Butanol-Methanol-Wasser (4:5:1). - Geringe Mengen einer kristallinen, stickstoffhaltigen Substanz fallen aus beim Einleiten von HCl-Gas in eine Lösung der Fraktion in abs. Äthanol-Chloroform; der Stoff beginnt bei 145° (KOFLER) zu sintern und zersetzt sich ohne eigentliches Schmelzen.

Ermittlung der freien Aminosäuren: In 30 ml der ausgeschüttelten Extraktlösung werden die Aminosäuren mittels NEUBERG-Fällung abgetrennt. Der Niederschlag wird einmal umgefällt und die aus der Zerlegung resultierende Aminosäurelösung auf 5 ml eingeengt. Davon werden jeweils 15 cmm zur Papierchromatographie aufgesetzt, die zweidimensional aufsteigend auf Bogen vom Format 25:25 cm erfolgt (S&S 2045 Gl). In erster Richtung dient Phenol (80 %ig, Gew.), in zweiter Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) als Laufmittel. Die Entfernung der Lösungsmittel geschieht im Trockenschrank bei 100°. Die gewanderten Substanzen werden mit 0,2 %iger äthanolischer Ninhydrinlösung, die etwas Pyridin und Eisessig enthält, sichtbar gemacht. Citrullin wird außerdem durch Aufsprühen einer Lösung von 5 % p-Dimethylaminobenzaldehyd in 10 %iger Salzsäure erkannt; es bildet sich eine gelbgrüne Färbung aus. Die Aminosäuren werden in Mischchromatogrammen identifiziert, Leucin und Isoleucin nach WIELAND und BAUER (20) mit Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (70:15:15) im Durchlaufchromatogramm auseinandergezogen.

Cholin: Die nach den Ausschüttelungen vorliegende Extraktlösung wird essigsauer gemacht und mit ges. Ammonreineckatlösung versetzt. Der Niederschlag wird in 200 ml Aceton-Wasser (1:1) gelöst und mit Silbersulfat behandelt. Das Filtrat wird salzfrei gemacht und zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 50 ml Wasser gelöst und mit wenig Natriumkarbonat versetzt. Ein mit n/2-Dipikrylaminmagnesiumsalz-Lösung fallender Niederschlag wird 2 mal aus Aceton-Chloroform (2:8) und 8 mal aus n-Propanol umkristallisiert: dünne, rotbraune Plättchen vom FP 236,5° (KOFLER). Ein Mischschmelzpunkt zeigt keine Depression. Eine C-H- und N-Bestimmung ergibt folgende Werte:

$C_4H_{14}ON \cdot C_{12}H_4O_{12}N_7$ (530,37)

Ber.:	C	37,64 %	H	3,35 %	N	20,66 %
Gef.:	C	38,06 %	H	3,33 %	N	20,99 %

Zur Überführung in das Goldsalz wird ein Teil des Dipikrylaminates in 50 ml Wasser suspendiert und mit etwas conc. Salzsäure versetzt. Das Filtrat wird mit Äther ausgeschüttelt, auf 10 ml eingeengt und mit Gold(III)-chlorid-Lösung (10 %ig) versetzt. Die entstehenden Kristalle werden 4 mal aus i-Propanol und 2 mal aus conc. Salzsäure umkristallisiert: dicke, gelbe Nadeln vom FP 242-245°. FP eines authentischen Präparates 244-247°; Mischschmelzpunkt 243-247° (KOFLER).

$C_5H_{14}ONCl \cdot AuCl_3$ (443,20) Ber.: 44,50 % Au Gef.: 45,12 % Au

Die Papierchromatographie erfolgt absteigend aus S&S 2043b Mgl. Es wird eine Cholinlösung aufgesetzt, die wie oben aus dem Dipikrylaminat hergestellt wird. Der gewanderte Stoff wird sichtbar gemacht entweder mit Phosphormolybdänsäure (die Streifen werden nach gründlichem Auswaschen in angesäuerte Zinn(II)-chloridlösung gelegt) oder mit dem Reagens nach THIES und REUTHER (10). R_f-Werte: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) 0,22, tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser (2:2:1) 0,39. Die Identifizierung erfolgt im Mischchromatogramm.

Arbeiten an einem Peptid: 1.) Isolierung. Aus dem Filtrat der Reinekatfällung wird das Reagens entfernt. Durch eine NEUBERG-Fällung wird der von TUNMANN und WOLF (1) gefundene Körper zusammen mit den freien Aminosäuren vom Extrakt abgetrennt. Die aus der Zerlegung der Fällung

resultierende Lösung wird streifenförmig auf einen Bogen S&S 2043b Mgl aufgetragen und mit Phenol (80 %ig,Gew.) in HCN-Atmosphäre entwickelt. Die Bogen werden 24 Stunden an der Luft getrocknet,dann noch vorhandenes Phenol mit Äther ausgewaschen. Die Lage des gesuchten Stoffes wird erkannt,indem man einen schmalen Streifen des Bogens mit Ninhydrinlösung besprüht; das Peptid gibt sich durch gelbbraune Färbung zu erkennen. Die Lage wird auf den Rest des Bogens übertragen,die Zone ausgeschnitten,kalt eluiert,die Lösung im Vakuum bei 35° eingeengt,auf einen anderen Bogen streifenförmig aufgetragen und mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) im Durchlaufchromatogramm entwickelt. Die Substanz wird wie oben eluiert,die Lösung zur Trockene gebracht: nadel- oder quaderförmige Kristalle,aus mehreren Chromatogrammen zusammen etwa 4 - 5 mg.
2.) Hydrolyse. Etwa 1 mg Substanz wird in 1 ml 6 n-Salzsäure gelöst und im zugeschmolzenen Röhrchen 30 Stunden auf 105° erhitzt,die Flüssigkeit danach über KOH im Vakuumexsikkator zur Trockene gebracht. Der in wenig Wasser aufgenommene Rückstand wird wie oben auf Aminosäuren untersucht. Der Cystin- und der Threoninfleck nimmt mit zunehmender Dauer der Hydrolyse an Intensität ab. - Etwa 1 mg Substanz wird in 0,75 ml Bariumhydroxydlösung (2,6 %ig) im zugeschmolzenen Röhrchen 36 Stunden auf 105° erhitzt. Die Lösung wird mit 5 ml Wasser versetzt und mit 10 %iger,dann 1 %iger Schwefelsäure neutralisiert. Der abzentrifugierte Niederschlag wird gewaschen,die Waschwässer mit der Flüssigkeit vereinigt,eingeengt und wie oben auf Aminosäuren untersucht.
3.) Amino-Endgruppe. Darstellung des DNP-Peptides nach SCHROEDER und LEGETTE (13). Das in Essigester ausgeschüttelte DNP-Peptid wird an Silikagel zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die Einheitlichkeit des so gewonnenen Produktes wird papierchromatographisch nach KOCH und WEIDEL (14) geprüft; R_f-Werte: Butanol-Ammoniak 0,38, 1,5 m-Phosphatpuffer 0,55. Hydrolyse in 6 n-Salzsäure wie oben,die freigewordene DNP-Aminosäure wird in Äther ausgeschüttelt. R_f-Werte in den Gemischen nach KOCH und WEIDEL (14): Butanol-Ammoniak 0,06, 1,5 m-Phosphatpuffer 0,56. Eine klare Unterscheidung zwischen DNP-Asparaginsäure und DNP-Glutaminsäure ist auf Bogen vom Format 50:50 cm nicht möglich. In Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (70:15:15) erfolgt eine einwandfreie Trennung; R_f-Wert der DNP-Asparaginsäure 0,62. - Die Bestimmung der Amino-Endgruppe nach der Phenylisothiocyanat-Methode erfolgt genau nach den Angaben von LANDMANN,DRAKE und DILLAHA (15). Es wird etwa 1 mg Substanz eingesetzt. Der R_f-Wert für die PTH-Asparaginsäure beträgt 0,37 mit 2-Butanol-Phthalatpuffer p_H 6 (7:1) auf phosphatgepuffertem (p_H 6) Papier. Die Farbe des Fleckes ist blau.
4.) Carboxyl-Endgruppe. Die Bestimmung erfolgt unter den von BAPTIST und BULL (16) angegebenen Bedingungen. Es wird etwa 1 mg Substanz eingesetzt. Die Identifizierung der Aminosäuren nach der Hydrolyse in Barytwasser erfolgt papierchromatographisch wie oben.

Harnstoff: Das Filtrat der NEUBERG-Fällung wird von Quecksilberionen befreit,nachdem man vorher mit Eisessig neutralisiert hat. Sodann versetzt man die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Eisessig. Der mit 10 %iger methanolischer Xanthydrollösung fallende Niederschlag wird 4 mal aus Dioxan-Wasser (9:1) umkristallisiert; FP 268° i.geschl. Röhrchen (Lindström),ein Mischschmelzpunkt mit authentischem Dixanthylharnstoff ergibt keine Depression. Die C-H- und N-Bestimmung führt zu folgenden Werten:

$C_{27}H_{20}N_2O_3$		(420,45)				
Ber.:	C	77,13 %	H	4,79 %	N	6,66 %
Gef.:	C	76,20 %	H	4,95 %	N	6,75 %

Die Hydrolyse erfolgt durch schwaches Erwärmen mit conc.Salzsäure. Die Flüssigkeit wird mit Äther bis zur Entfärbung ausgeschüttelt, sorgfältig mit Natronlauge neutralisiert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Eine Extraktion des Trockenkörpers mit heißem Chloroform führt zu Harnstoff; FP 133,5 - 134°,ein Mischschmelzpunkt zeigt keine Depression. Der papierchromatographische Nachweis geschieht absteigend auf S&S 2043b Mgl im Mischchromatogramm; R_f-Werte: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) 0,46, tert.Butanol-Methanol-Wasser (4:5:1) 0,50. Das Sichtbarmachen des gewanderten Harnstoffes erfolgt durch Besprühen mit einer Lösung von 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 20 %iger Salzsäure (grüngelbe Färbung) oder mit dem von LIST (21) angegebenen Reagens (rosa Flecke auf schwach gelbem Grund).

Literaturverzeichnis

1.) Tunmann,P. u. G.Wolf: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 289,459 (1956)

2.) Mazza,F.P. u. S.Greco: L'Officina 1,4 (1928)

3.) Power,F.B. u. Ch.W.Moore: J.chem.Soc.(Lond.) 99,937 (1911)

4.) Angeletti,A.: Boll.Sedute Accad.Gioenia Sci.Naturali Catania (3) 1938 Nr.9

5.) Power,F.B. u. A.H.Salway: J.chem.Soc.(Lond.) 103,399 (1913)

6.) Klein,G. u. G.Steiner: Jahrb.wiss.Botanik 68,602 (1928)

7.) Francois,M.: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 144,567,857 (1907)

8.) Steiner,M. u. E.Stein v.Kamienski: Naturwiss. 40,483 (1953)

9.) Neu,R. u. U.Fiedler: Naturwiss. 41,259 (1954)

10.) Thies,H. u. F.W.Reuther: Naturwiss. 41,230 (1954)

11.) Zellner,J. u. E.Taschner: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 265,27 (1927)
Angeletti,A. u. D.Ponte: Gazz.chim.ital. 64,569 (1934)
und die unter 2.) und 3.) angeführten Autoren

12.) Neuberg,C. u. J.Kerb: Biochem.Z. 40,498 (1912)

13.) Schroeder,W.A. u. J.LeGette: J.Amer.chem.Soc. 75,4612 (1953)

14.) Koch,G. u. W.Weidel: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 303,213 (1956)

15.) Landmann,W.A.,Drake,M.P. u. J.Dillaha: J.Amer.chem.Soc. 75,3638 (1953)

16.) Baptist,V.H. u. H.B.Bull: J.Amer.chem.Soc. 75,1727 (1953)

17.) Wieland,T. u. L.Wirth: Ber.dtsch.chem.Ges. 82,468 (1949)
Bremner,J.: Nature (London) 168,518 (1951)

18.) Klein,G. u. K.Tauböck: Biochem.Z. 251,10 (1932) u. 255,278 (1932)

19.) Whittacker,V.P.: Biochemic.J. 49,45 (1951)

20.) Wieland,T. u. L.Bauer: Angew.Chem. 63,511 (1951)

21.) List,P.H.: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 303,27 (1955)

RUDOLF BAENR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG